مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
سال ۱۳۹۸، دوره ۲۱، صفحه ۱۳۴-۱۲۷

بررسی نقش و عملکرد آنزیم های کلبسیلا پنومونیه کارباپنماز و متالوبتالاکتاماز در بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از زخم سوختگی

حامد طهماسبی (Msc)[۱]، فخرالدین ملکی (Msc)[۲]، ساناز ده باشی (Msc)[۳]، محمدرضا عربستانی (PhD)[۴*]

۱-گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
۲-گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، همدان، ایران
۳-گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۴-مرکز تحقیقات بروسلوز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

دریافت: ۹۷/۵/۷، اصلاح: ۹۷/۱۱/۲۸، پذیرش: ۹۷/۱۲/۲۷

خلاصه

سابقه و هدف: *سودوموناس آئروژینوزا* یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد. عوامل بیماری‌زا در این باکتری ممکن است در بروز مقاومت‌های کارباپنمی و بتالاکتامی نقش داشته باشد. هدف از این مطالعه بررسی نقش و عملکرد آنزیم‌های KPC و MBL در افزایش بیماری‌زایی *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از زخم سوختگی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، ۶۳ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* از زخم سوختگی بیماران مختلف، با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی مانند تخمیر قندها در محیط OF، تست اکسیداز و غیره، جداسازی شد. تعیین الگوی مقاومت و سویه‌های متالوبتالاکتاماز و کارباپنماز با روش انتشار از دیسک صورت گرفت. جهت تایید مولکولی ایزوله های جمع آوری شده، از ژن *oprD* استفاده شد. همچنین، از روش PCR جهت شناسایی ژن‌های عامل بیماری‌زایی استفاده گردید.

یافته‌ها: از مجموع ۶۳ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بیماران سوختگی، ۱۰ ایزوله (۱۵/۸۳ ٪) دارای آنزیم KPC و ۱۳ ایزوله (۲۰/۶۳ ٪) دارای آنزیم MBL بودند. آنتی‌بیوتیک‌های دوریپنم، ارتاپنم و مروپنم دارای بیشترین فراوانی بودند. همچنین، ژن *lasB* در ۴۳ ایزوله (۶۸/۲۵ ٪)، ژن *plcN* در ۴۱ ایزوله (۶۵/۰۷ ٪)، ژن *lasA* در ۲۰ ایزوله (۳۱/۷۴ ٪)، ژن *apr* در ۶۰ ایزوله (۹۵/۲۳ ٪)، ژن *phzI* در ۵۳ ایزوله (۸۴/۱۲٪)، ژن *phzII* در ۳۸ ایزوله (۶۰/۳۱ ٪)، ژن *phzH* در ۳۰ ایزوله (۴۷/۶۱ ٪) و ژن *plcH* در ۵۶ ایزوله (۸۸/۸۸ ٪) مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد که تولید آنزیم‌های کارباپنماز و متالوبتالاکتاماز سبب افزایش بیماری‌زایی *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از زخم سوختگی می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: مقاومت آنتی بیوتیکی، *سودوموناس آئروژینوزا*، فاکتور بیماری‌زایی، آنتی بیوتیک کرباپنمی.

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد و در افرادی که دچار ضعف سیستم ایمنی هستند موجب بروز بیماری‌های عفونی مختلف می‌شود(۱). در هنگام استفاده از کاتترها، آسیب دیدن بافت پوست مانند پارگی و یا سوختگی، *سودوموناس آئروژینوزا* به لایه های مخاطی زیرین متصل می‌شود و بعد از تثبیت موقعیت خود، در سایر بافت‌های دیگر منتشر شده و بیماری سیستمیک ایجاد می‌کند(۳و۲). یکی از مهمترین فاکتورهای بیماری‌زایی در *سودوموناس آئروژینوزا*، بیوفیلم می‌باشد. آلژینات تولید شده توسط *سودوموناس آئروژینوزا* عامل اصلی تولید بیوفیلم می باشد. در این باکتری، کروم سنسینگ توسط دو سیستم *las* و *rhl* کنترل می‌گردد (۵و۴). سیستم *las* شامل ژن‌های فعال کننده رونویسی *lasR* و *lasI* ، و سیستم *rhl* شامل ژن های *rhlI* و *rhlR* می‌باشد. ژن *lasI* تولید الاستاز، اگزوتوکسین A و آلکالین پروتئاز را تنظیم می کند(۴). دو نوع فسفولیپاز (PLC) توسط *سودوموناس آئروژینوزا* تولید می‌شود؛ فسفولیپاز با وزن مولکولی بالا که همولیتیک است (PLC-H)، در حالی که فسفولیپاز با وزن مولکولی پایین غیر همولیتیک (PLC-N) می‌باشد که باعث تجزیه سولفیدریل کولین می‌شود که موجب آزاد شدن دی‌آسیل گلیسرول و کولین می‌شود(۶). در کنار این عوامل، وجود فنیزین و پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی نیز می توانند در بیماری‌زایی *سودوموناس آئروژینوزا* نقشی جدی داشته باشند. در این بین دو اوپرون *phzA1* و *phzA2* نقش اصلی در کنترل و تنظیم تولید فنیزین

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی هیئت علمی با شماره ۹۵۱۰۰۷۵۷۵۵ دانشگاه علوم پزشکی همدان می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر محمدرضا عربستانی
آدرس: همدان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه میکروبشناسی. تلفن: ۰۸۱-۲۳۸۳۸۰۷۷
E-mail:mohammad.arabestani@gmail.com

در این باکتری را بر عهده دارند(۷). آنزیم‌های بتالاکتامازی که مقاومت به گروه‌های مختلف بتالاکتامی را سبب می‌شود، براساس طبقه بندی ساختاری، به چهار گروه A تا D تقسیم می‌شوند(۸). بتالاکتامازهای گروه‌های A و C رایج ترین آنها می‌باشد و همانند کلاس D در جایگاه فعال خود دارای اسیدآمینه سرین می‌باشد. بتالاکتامازهای کلاس B شامل متالوبتالاکتامازها می باشد و کوآنزیم آنها فلز روی است (۹). کاربانیم‌ها که در گروه A آمبر جای می‌گیرند، برای درمان عفونت‌های جدی در بیمارستان‌ها بکار گرفته می‌شوند (۱۰). در مقایسه با پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها یا بتالاکتام‌های حاوی مهارکننده بتالاکتاماز، طیف اثر ضدمیکروبی وسیعی دارند که شامل باکتری‌های گرم مثبت (مثل ایمی‌پنم، دوری‌پنم) و گرم منفی (مثل مروپنم، ارتاپنم) می‌باشند(۱۲و۱۱).

ایمی‌پنم و مروپنم فعالیت بهتری روی *سودوموناس آئروژینوزا* دارند. برای درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم به ترکیبات بتالاکتام، از کاربانیم‌ها (ایمیپنم–مروپنم) که نسبت به بتالاکتام‌ها مقاوم می‌باشند، استفاده می‌شود. اما، در سال‌های اخیر مقاومت به کاربانیم‌ها در بسیاری از موارد گزارش شده است. این مقاومت به علت کاهش نفوذ دارو و تولید آنزیم‌های هیدرولیزکننده کاربانیم‌ها می‌باشد. این آنزیم‌ها طیف سوبستراتی وسیعی دارند و قادر به هیدرولیز تمام بتالاکتام‌ها به جز مونوباکتام (آزترونام) هستند(۱۳). ژن‌های کد کننده این آنزیم‌ها بر روی اینتگرون‌ها قرار گرفته و می‌توانند در پلاسمید یا کروموزوم ادغام شوند. لذا قابلیت انتقال به سویه های حساس *سودوموناس آئروژینوزا* را نیز دارند (۱۴). در برخی مطالعات به ارتباط بین مقاومت آنتی بیوتیکی و حضور عوامل بیماری زایی *سودوموناس آئروژینوزا* پرداخته شده است، اما این موضوع که سویه های دارای آنزیم کاربانیماز و متالوبتالاکتاماز از نظر الگوی بیماری زایی چه تفاوتی با یکدیگر دارند، مورد بررسی قرار نگرفته است(۱۵).

هدف از این مطالعه تعیین نقش و عملکرد آنزیم‌های *کلبسیلا پنومونیه* کاربانیماز و متالوبتالاکتاماز در افزایش بیماری زایی *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از زخم سوختگی می باشد تا بتوان به الگوی مناسبی از نظر بیماری زایی و بروز مقاومت‌های متالوبتالاکتامازی و کاربانیمازی در *سودوموناس آئروژینوزا* دست یافت.

مواد و روش ها

جداسازی، شناسایی و کشت باکتری ها: در این مطاله مقطعی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان با کد IR.UMSHA.REC.۱۳۹۵.۲۴۹، نمونه‌های زخم سوختگی از بیمارستان های منتخب شهر همدان در طی ۹ ماه از بهمن ۹۵ تا آذر ۹۶ جمع‌آوری شدند. شرایط ورود نمونه ها به این مطالعه، بستری بودن افراد در بخش های سوختگی و دارا بودن عفونت های پوستی شدید لحاظ گردید و عامل خروج نیز افراد فاقد عفونت سوختگی در نظر گرفته شد. روش نمونه گیری بصورت آسان، سریع و دردسترس و تصادفی لحاظ گردید. ایزوله های بدست آمده از زخم سوختگی بر روی محیط پایه بلاد آگار (Merck، آلمان) کشت داده شد و کلنی‌ها بعد از خالص سازی جهت تعیین جنس و گونه، بر روی محیطهای اختصاصی *سودوموناس آئروژینوزا* کشت داده شد. جهت تایید مولکولی ایزوله های جمع آوری شده، از ژن *oprD* استفاده گردید (۱۶).

بررسی الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی: تعیین حساسیت ایزوله های بالینی به ۵ آنتی بیوتیک مختلف شامل سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم)، ایمیپنم (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰میکروگرم)، ارتاپنم (۱۰میکروگرم)، دوریپنم (۳۰ میکروگرم) و آزترونام (۳۰ میکروگرم) (Mast، انگلستان) با استفاده از روش Kirby-Bauer Disk Diffusion، انجام شد. برای به حداقل رساندن آلودگی، دیسک ها توسط دستگاه Disc Dispenser(Mast، انگلستان) روی سطح پلیت قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۵°C، قطر هاله‌های عدم رشد با استفاده از آخرین نسخه موسسه استاندارد بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) مورد بررسی قرار گرفتند(۱۷).

تعیین سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای دارای آنزیم KPC: جهت تعیین ایزوله های دارای آنزیم کاباپنماز از تست اصلاح شده هوچ استفاده گردید. در این روش، براساس روش Kouhsari و همکاران تمامی مراحل انجام شد. از سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853 به عنوان کنترل منفی و از سویه *کلبسیلا پنومونیه* ATCC 700603 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (۶).

تعیین سویه های سودوموناس آئروژینوزای دارای آنزیم MBL: از روش انتشار از دیسک جهت مشخص کردن سویه های متالوبتالاکتاماز استفاده شد. به این صورت که دیسک ایمیپم به تنهایی در مجاورت یک دیسک IMP-EDTA قرار داده شد. براساس مطالعه Panchal و همکاران، در صورتیکه قطر هاله عدم رشد دیسک IMP-EDTA نسبت به دیسک IMP بیشتر از ۷ میلی میتر باشد، سویه MBL مثبت و اگر کمتر از ۷ میلی‌متر باشد MBL منفی در نظر گرفته می‌شود (۱۳).

استخراج ژنومی با استفاده از روش جوشاندن: جهت استخراج DNA از روش جوشاندن استفاده گردید. کلیه مراحل کار با توجه به مطالعه Shahbazi و همکاران بهینه شد (۱۸).

آماده سازی پرایمر ها و انجام PCR: پرایمرهای مورد استفاده بعد از رقیق سازی با غلظت ۱۰ پیکومولار برای تهیه مخلوط PCR استفاده گردید. حجم نهایی واکنش PCR ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد که شامل: ۱میکرولیتر از DNA الگو، ۱میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت۱۰پیکومولار و ۱۲میکرولیتر از مسترمیکس (Ampliqonآلمان) استفاده شد. برای تکثیر ژن های مورد مطالعه از ترموسایکلر BioRad C1001(آمریکا) استفاده شد. برای تمامی ژن‌های مراحل دمایی واسرشت سازی اولیه و طویل سازی نهایی به ترتیب ۹۶ درجه سلسیوس و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه لحاظ گردید(جدول ۱).

الکتروفورز روی ژل اگارز ۱/۵ درصد: ۵ میکرولیتر از محصول نهایی PCR در ژل اگارز۱/۵درصد در بافر ۰/۵X الکتروفورز گردید. از مارکر bp ۱۰۰فرمنتاز (Thermofisher آمریکا) برای شناسایی باند مورد نظر استفاده شد. در این بررسی از سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC27853 و 14425 ATCC بعنوان کنترل مثبت و از سویه *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 15692 بعنوان کنترل منفی استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده ها: نتایج بدست آمده از تعیین مقاومت های آنتی بیوتیکی به روش فنوتیپی با استفاده از نرم افزار WHOnet نسخه ۵/۵ مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و با آزمون آماری χ^2 تجزیه و تحلیل شدند و $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

جدول۱. لیست پرایمرها و تنظیمات دمایی مورد استفاده جهت تکثیر ژن های عوامل بیماری‌زای *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از زخم سوختگی

ژن‌ها	توالی نوکلئوتیدی	طول قطعات(bp)	تنظیمات دمایی	منابع
lasB	F: GGAATGAACGAAGCGTTCTCCGAC R: TGGCGTCGACG*AACA*CCTCG	۲۸۴	۳۵(۱ دقیقه°C۹۶، ۵۰ ثانیه°C۵۸، ۱ دقیقه °C۷۲)	(۱۹)
lasA	F: GCAGCACAAAAGATCCC R: GAAATGCAGGTGCGGTC	۱۰۷۵	۳۵(۱ دقیقه°C۹۶، ۵۰ ثانیه°C۵۷، ۱ دقیقه °C۷۲)	(۱۹)
plcH	F: GCACGTGGTCATCCTGATGC R: TCCGTAGGCGTCGACGTAC	۶۰۸	۳۵(۱ دقیقه°C۹۶، ۵۵ ثانیه°C۵۷، ۱ دقیقه °C۷۲)	(۱۹)
plcN	F: TCCGTTATCGCAACCAGCCCTACG R: TCGCTGTCGAGCAGGTCGAAC	۴۸۱	۳۵(۱ دقیقه°C۹۶، ۱ دقیقه°C۵۷، ۱ دقیقه °C۷۲)	(۱۹)
apr	F: TGTCCAGCAATTCTCTTGC R: CGTTTTCCACGGTGACC	۱۰۱۷	۲۵(۱ دقیقه°C۹۶، ۴۵ ثانیه°C۵۹، ۱ دقیقه °C۷۲)	(۱۹)
phzII	F: GCCAAGGTTTGTTGTCGG R: CGCATTGACGATATGGAAC	۱۰۳۶	۲۵(۱ دقیقه°C۹۶، ۵۰ ثانیه°C۵۶، ۱ دقیقه °C۷۲)	(۱۹)
phzI	F: CATCAGCTTAGCAATCCC R: CGGAGAAACTTTTCCCTC	۳۹۲	۳۵(۱ دقیقه°C۹۶، ۱ دقیقه°C۵۸، ۱ دقیقه °C۷۲)	(۱۹)
phzH	F: GGGTTGGGTGGATTACAC R: CTCACCTGGGTGTTGAAG	۱۷۵۲	۲۵(۱ دقیقه°C۹۶، ۵۰ ثانیه°C۵۹، ۱ دقیقه °C۷۲)	(۱۹)

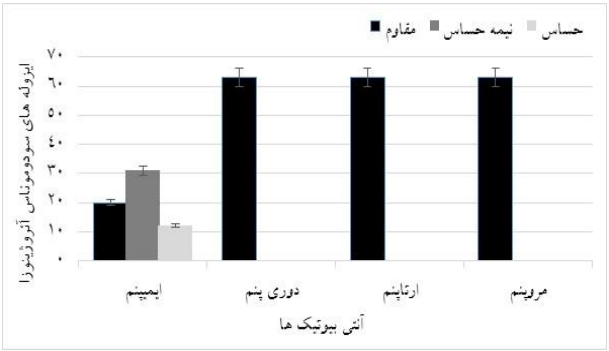
یافته ها

نتایج جداسازی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* از زخم سوختگی: از مجموع ۲۵۰ ایزوله مورد بررسی، ۶۳ ایزوله (۲۵/۲٪) به عنوان *سودوموناس آئروژینوزا* از نمونه‌های زخم سوختگی بدست آمد.

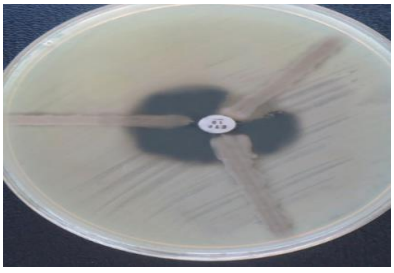
نتایج الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی: از مجموع ۶۳ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بیماران سوختگی، سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک ایمی‌پنم دارای کمترین فراوانی و سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌های دوریپنم، ارتاپنم و مروپنم دارای بیشترین فراوانی بودند(نمودار۱).

نتایج ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از زخم دارای آنزیم‌های کارباپنماز و متالوبتالاکتاماز: از مجموع ۶۳ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بیماران سوختگی، ۱۰ ایزوله (۱۵/۸۳ ٪) دارای آنزیم KPC و ۱۳ ایزوله (۲۰/۶۳ ٪) دارای آنزیم MBL بودند (شکل ۲و۱).

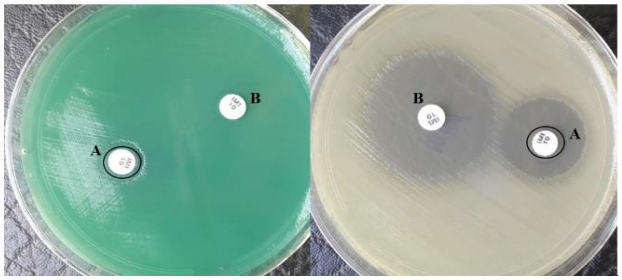
نتایج حاصل از تکثیر ژن‌های عوامل بیماری زا در ایزوله‌های سوختگی *سودوموناس آئروژینوزا*: الگوی پراکنش ژن‌های عوامل بیماری زا به این صورت بود که ژن *lasB* در ۴۳ ایزوله (۶۸/۲۵ ٪)، ژن *plcN* در ۴۱ ایزوله (۶۵/۰۷ ٪)، ژن *lasA* در ۲۰ ایزوله (۳۱/۷۴ ٪)، ژن *apr* در ۶۰ ایزوله (۹۵/۲۳ ٪)، ژن *phzI* در ۵۳ ایزوله (۸۴/۱۲٪)، ژن *phzII* در ۳۸ ایزوله (۶۰/۳۱٪)، ژن *phzH* ۳۰ ایزوله (۴۷/۶۱٪) و ژن *plcH* در ۵۶ ایزوله (۸۸/۸۸ ٪)، مشاهده گردید(نمودار۲). نتایج آزمون نشان داد که ارتباط معنی داری بین حضور آنزیم های KPC و ژن های عامل بیماری زایی، آنزیم MBL و ژن های عامل بیماری زایی وجود دارد (جدول ۳و۲).



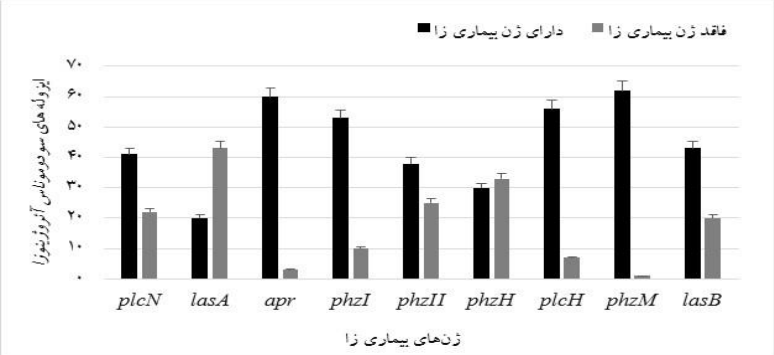
نمودار۱. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از زخم سوختگی



شکل۱. سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* دارای آنزیم KPC



شکل۲. سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* دارای آنزیم MBL (سمت راست) و فاقد آنزیم MBL (سمت چپ). A: دیسک IMP. B: دیسک IMP+EDTA



نمودار۲. فراوانی ژن‌های بیماری زا در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا

جدول۲. بررسی ارتباط آماری در متغیرهای مورد مطالعه در ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزا* حامل آنزیم KPC جدا شده از زخم سوختگی

متغیرها	سودوموناس آئروژینوزا	دارای آنزیم KPC	فاقد آنزیم KPC	سطح	P-value
lasA		۹	۱۱	A*	≤۰/۰۰۳
		۱	۴۲	B*	
lasB		۱۰	۰	A	≤۰/۰۰۱
		۰	۵۳	B	
plcH		۸	۲	A	≤۰/۰۰۸
		۲	۵۱	B	
plcN		۱۰	۰	A	≤۰/۰۰۱
		۰	۵۳	B	
apr		۸	۲	A	≤۰/۰۰۸
		۲	۵۱	B	
phzII		۹	۱	A	≤۰/۰۰۵
		۱	۵۲	B	
phzI		۹	۱	A	≤۰/۰۰۳
		۱	۵۲	B	
phzH		۱۰	۰	A	≤۰/۰۰۱
		۰	۵۳	B	

A: تشخیص حضور. B: عدم تشخیص حضور

جدول۳. بررسی ارتباط آماری در متغیرهای مورد مطالعه در ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزا* حامل آنزیم MBL جدا شده از زخم سوختگی

متغیرها	سودوموناس آئروژینوزا	دارای آنزیم MBL	فاقد آنزیم MBL	سطح	P-value
lasA		۱۲	۱	A*	≤۰/۰۰۷
		۱	۴۹	B*	
lasB		۱۳	۰	A	≤۰/۰۰۵
		۰	۵۰	B	
plcH		۱۳	۰	A	≤۰/۰۰۵
		۰	۵۰	B	
plcN		۱۱	۲	A	≤۰/۰۰۷
		۲	۴۸	B	
apr		۳۹	۱۱	A	≤۰/۰۰۶
		۱۰	۳	B	
phzII		۹	۲	A	≤۰/۰۰۹
		۴	۴۸	B	
phzI		۱۰	۳	A	≤۰/۰۰۶
		۳	۴۷	B	
phzH		۱۱	۲	A	≤۰/۰۰۷
		۲	۴۸	B	

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که فراوانی آنتی بیوتیک های کارباپنمی در ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از زخم سوختگی بسیار بالا، ولی سویه های دارای آنزیم MBL و KPC بسیار کم مشاهده شد. این در حالی بود که ایزوله های مورد بررسی به بیشتر آنتی بیوتیک ها کلاس های دیگر مانند سفپودوکسیم و سفتریاکسون مقاومت ۱۰۰ درصدی داشتند. در مطالعه Akhavan-Tafti و همکاران بر روی بررسی فراوانی آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* از زخم‌های سوختگی ۲۹/۵ درصد دارای آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند(۲۰).

در مطالعه Golshani و همکاران نشان داده شد که ۱۸ درصد ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* حامل MBL بودند(۲۱). در مطالعه Malek Mohamad و همکاران نیز مشخص شد که بیشترین فراوانی مربوط به آنتی-بیوتیک مروپنم می باشد. همچنین Khorvash و همکاران نیز نشان دادند که در ایزوله های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* بیش از ۶۰ درصد از ایزوله های به آنتی-بیوتیک‌های کرباپنم مقاومت کامل داشتند(۲۳و۲۲). در مطالعات Sobouti و همکاران و Liakopoulos و همکاران فراوانی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* تولید کننده KPC و MBL بیشتر از مطالعه ما گزارش شد(۲۵و۲۴). این عدم همخوانی را می توان به محدود بودن مطالعه حاضر در حجم نمونه اشاره کرد. زیرا یکی از عیوب مطالعات توصیفی– مقطعی و غیر اپیدمیولوژیکی، محدود بودن نمونه و زمان می باشد. با بسط دادن بازه زمانی در سال‌ها و فصول مختلف و گرفتن نمونه در سالهای مختلف، می‌توان این خطا را تا حدود زیادی کاهش داد. علاوه بر این، الگوی مصرف آنتی بیوتیکی و تفاوت سویه ها با توجه به الگوی‌های خاص آن منطقه، شرایطی را فراهم می آورد که باکتری‌ها بتوانند با سرعت بیشتری مقاومت را منتقل کنند. البته نباید این نکته را از نظر دور کرد که فراوانی سویه های MBL و KPC در *سودوموناس آئروژینوزا* در قسمت آسیا الگوی متفاوتی را دنبال می کنند. به نحوی که فراوانی این سویه ها بسیار کم می باشد. در حالیکه بیشتر گزارشات نشان از مقاومت بالای گروه پنمی در ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزا* دارد. بطوریکه در مطالعه Hong و همکاران مشخص شد که بالاترین مقاومت در ایزوله های سودوموناس در کشور های کره، چین و تایوان می باشد که مقاومت به ایمیپنم، دوریپنم و مروپنم دارای بیشترین فراوانی بود(۲۶). در مطالعه حاضر ژن‌های عامل بیوفیلم، فنیزین و لایه های لعابی خارجی دیواره سلولی دارای بیشترین فراوانی بودند. در مطالعه Tutunchi و همکاران که بر روی ایزوله های سودوموناس صورت گرفت مشخص شد که ۹۶/۵ درصد ایزوله‌ها حامل ژن *phzI*، ۹۳/۱ درصد ایزوله ها حامل ژن *phzII* و ۲۷/۲ درصد ایزوله‌ها نیز حامل *phzH* بودند(۲۷). همچنین مطالعاتی که Meskini و همکاران و Radlinski و همکاران بر روی ایزوله های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* داشتند، نشان داد که فراوانی ژن‌های عامل کروم سنسینگ و بیوفیلم نقش بسیار زیادی در بیماری زا بودن و ایجاد مقاومت به برخی آنتی بیوتیک ها را دارند که از این نظر با دو مطالعه ذکر شده کاملا همخوانی دارد. بطوریکه در مطالعه حاضر، تمامی ژن های عامل بیماری زا دارای فراوانی بسیار بالایی بودند، به طوریکه ۱۵ درصد ایزوله های مورد مطالعه تمامی ژن های عوامل بیماری زای مورد بررسی را داشتند و دارای مقاومت ۱۰۰ درصدی به گروه پنم آنتی بیوتیکی بودند. یکی از مهم ترین مواردی که در این مطالعه بررسی شد، وجود برخی متغیرها در تغییر الگوی بیماری زایی و یا مقاومتی باکتری بود، یکی از مهمترین مسائلی که مطرح گردید، وجود چند باکتری در محل زخم و فعالیت این دو باکتری علیه هم می تواند بیماری زا بودن باکتری دیگر را دستخوش تغییر قرار دهد. مانند باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* که در همراهی با باکتری استافیلوکوک اورئوس در نمونه های زخم، تغییرات گسترده ای را در بیماری زایی و مقاومت آنتی بیوتیکی خود اعمال می کند(۲۹و۲۸).

نتایج این مطالعه نشان داد که بین فعالیت آنزیم های KPC و MBL و بیماری‌زا بودن ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از زخم سوختگی ارتباط معنی داری وجود دارد و ممکن است حضور این آنزیم ها بیماری زایی باکتری را دستخوش تغییر قرار دهند. این در حالی است که عوامل متعدد دیگری نیز در فراوانی ژن های عامل بیماری زا در *سودوموناس آئروژینوزا* دخالت دارند. Gupta و همکاران نشان دادند که حضور برخی عوامل بیماری‌زا ازجمله بیوفیلم، کروم سنسینگ و نقص سیستم ایمنی میزبان می‌تواند میزان آسیب‌رسانی این باکتری را بیشتر کند و همچنین باکتری را در مقابل درمان مقاوم‌تر کند. نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر نیز نشان داد که ژن های تولید کننده پیلی، فنازین، ژن های ایجاد کننده بیوفیلم و لایه های لعابی در کنار برخی ژن های کنترلی مانند *apr* موید این امر بودند که تنظیم و کنترل ژن های بیماری زا با توجه به وجود و یا عدم وجود برخی فاکتورهای محیطی می تواند دستخوش تغییرات زیادی قرار بگیرد که در ایزوله های جدا شده از زخم سوختگی این امر به وضوح دیده شد(۳۰). تجزیه و تحلیل حاصل از این مطالعه نشان داد که، ارتباط معنی داری بین حضور آنزیم های عامل مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بیماری زایی *سودوموناس آئروژینوزا* جدا سازی از زخم‌های سوختگی وجود دارد.

زیرا *سودوموناس آئروژینوزا* طیف وسیعی از آنزیم‌های بیماری زا و مقاومتی مانند کارباپنماز و متالوبتالاکتاماز را تولید می کند و شدت بیماری زایی این باکتری با توجه به بافت هدف می‌تواند متغیر باشد و در بافت های سطحی مانند پوست، این مقاومت و بیماری زایی بیشتر است. از طرفی، نتایج این مطالعه نشان داد که با بیماری‌زا تر شدن *سودوموناس آئروژینوزا* میزان مقاومت و فعالیت آنزیم های کارباپنمازی و متالوبتالاکتامازی نیز افزایش می یابد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان و پرسنل آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه به دلیل همکاری در این مطالعه، تقدیر و تشکر می گردد.

Role and Function of KPC and MBL Enzymes in Increasing the Pathogenicity of Pseudomonas Aeruginosa Isolated from Burn Wounds

H. Tahmasebi (MSc)[1], F. Maleki (MSc)[2], S. Dehbashi (MSc)[3], M.R. Arabestani (PhD)*[4]

1.Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, I.R.Iran
2.Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Hamadan University of Basic Azad University, Hamadan, I.R.Iran
3.Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran
4.Brucellosis Research Center, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 21; 2019; PP: 127-34
Received: July 29th 2018, Revised: Feb 17th 2019, Accepted: Mar 18th 2019.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: *Pseudomonas aeruginosa* is one of the main causes of hospital infections. Pathogenic factors in this bacterium may play a role in the resistance to carbapenem and beta-lactam. The purpose of this study was to evaluate the role and function of KPC and MBL enzymes in increasing the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wounds.

METHODS: In this cross-sectional study, 63 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from burn wounds of different patients were isolated using biochemical tests such as fermentation of sugars in the OF medium, oxidase test, and so on. Determination of resistance pattern and strains with metallobetalactamase and carbapenema was done by disc diffusion method. The oprD gene was used for molecular confirmation of isolates. PCR method was used to detect pathogenicity genes.

FINDINGS: Out of 63 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients, 10 isolates (15.83%) had KPC enzyme and 13 isolates (20.63%) had MBL enzymes. Doripenem, Ertapenem and meropenem were the most frequent. Also, the lasB gene was observed in 43 isolates (68.25%), plcN gene in 41 isolates (65.07%), lasA gene in 20 isolates (31.74%), apr in 60 isolates (95.23%), phzI gene in 53 isolates (84.12%), the phzII gene in 38 isolates (60.31%), phzH gene in 30 isolates (47.61%) and plcH gene in 56 isolates (88.88%).

CONCLUSION: The results of this study showed that the production of Carbapnemase and MBL enzymes increased the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wounds.

KEY WORDS: *Antibiotic Resistance, Pseudomonas Aeruginosa, Virulence Factors, Carbapenem Antibiotics*.

Please cite this article as follows:
Tahmasebi H, Maleki F, Dehbashi S, Arabestani MR. Role and Function of KPC and MBL Enzymes in Increasing the Pathogenicity of Pseudomonas Aeruginosa Isolated from Burn Wounds. J Babol Univ Med Sci. 2019;21:127-34.

***Corresonding Author: M.R. Arabestani (PhD)**
Address: Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran
Tel: +98 81 23838077
Email: mohammad.arabestan@gmail.com

References

1.Gonzalez MR, Fleuchot B, Lauciello L, Jafari P, Applegate LA, Raffoul W, et al. Effect of Human Burn Wound Exudate on Pseudomonas aeruginosa Virulence. mSphere. 2016;1(2):e00111-15.

2.Lashgarian H, Marzban A, Estaji M, Gholami M, Masoumi asl H, Raheb J. Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) for Typing Pseudomonas Aeruginosa Isolated from Urine Samples of Different Patients. J Babol Univ Med Sci. 2018; 20(2):56-63

3.Tahmasebi H, Yousef Alikhani M, Dehbashi S, Arabestani MR. Investigation of the relationship between the presence of chromosomal and plasmid-encoded ampc genes and type of clinical specimen in pseudomonas aeruginosa. J Babol Univ Med Sci. 2018; 20(3):36-43.

4.Salehi Z, Amini K, Kheirkhah B. Molecular Identification of Quorum Sensing Genes in Clinical Strains of Pseudomonas aeruginosa and Antibiotic Resistance Profile. J Babol Univ Med Sci. 2017; 19(4):46-53.

5.Burr LD, Rogers GB, Chen AC, Hamilton BR, Pool GF, Taylor SL, et al. Macrolide Treatment Inhibits Pseudomonas aeruginosa Quorum Sensing in Non-Cystic Fibrosis Bronchiectasis. An Analysis from the Bronchiectasis and Low-Dose Erythromycin Study Trial. Ann Am Thorac Soc. 2016; 13(10):1697-703.

6.Kouhsari E, Zahedi bialvaei A, Fakhre Yaseri H, Samadi Kafil H, Mohamadzade R, Rahbar M. A review on common laboratory methods for detection of carbapenemase Gram-negative bacilli. Razi J Med Sci. 2018; 24(165):47-65

7.Ertugrul BM, Oryasin E, Lipsky BA, Willke A, Bozdogan B. Virulence genes fliC, toxA and phzS are common among Pseudomonas aeruginosa isolates from diabetic foot infections. Infect Dis. 2018;50(4):273-9.

8.Dehbashi S, Tahmasebi H, Zeyni B, Arabestani MR. The relationship between promoter-dependent quorum sensing induced genes and methicillin resistance in clinical strains of staphylococcus aureus. J Zanjan Univ Med Sci Health Servic. 2018;26(116):75-87.[In Persian]

9.Ahdi Khosroshahi S, Farajnia S, Azhari F, Hosseini MK, Khanipour F, Farajnia H, et al. Antimicrobial Susceptibility Pattern and Prevalence of Extended-Spectrum β-Lactamase Genotypes among Clinical Isolates of Acinetobacter baumanii in Tabriz, North-West of Iran. Jundishapur J Microbiol. 2017;10(6):e13368.

10.Tahmasebi H, Dehbashi S, Arabestani MR. High resolution melting curve analysis method for detecting of carbapenemases producing pseudomonas aeruginosa. J Krishna Instit Med Sci Univ. 2018;7(4):70-7.

11.Ding Y, Teo J, Drautz-Moses DI, Schuster SC, Givskov M, Yang L. The Acquisition of Resistance to Carbapenem and Macrolide-mediated Quorum Sensing Inhibition by Pseudomonas aeruginosa via a Novel Integrative and Conjugative Element ICETn43716385. bioRxiv. 2017:161497.

12.Sah S, Hemalatha S. Extended spectrum beta lactamase (ESBL) mechanism of antibiotic resistance and epidemiology. Int J PharmTech Res. 2015; 7(2):303-9.

13.Panchal CA, Oza SS, Mehta SJ. Comparison of four phenotypic methods for detection of metallo-β-lactamase-producing Gram-negative bacteria in rural teaching hospital. J Lab Physicians. 2017;9(2):81-3.

14.Fazeli H, Moslehi Z, Irajian G, Salehi M. Determination of Drug resistance patterns and detection of bla-VIM gene in Pseudomonas aeruginosastrains Isolated from burned patients in the Emam Mosa Kazem hospital, Esfahan, Iran (2008-9). Iran J Med Microbiol. 2010;3(4):1-8.[In Persian]

15.Hwang S, Kim CY, Ji S-G, Go J, Kim H, Yang S, et al. Network-assisted investigation of virulence and antibiotic-resistance systems in Pseudomonas aeruginosa. Sci Rep. 2016;6:26223.

16.Connie M, Lehman D, Manuselis G. Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. St. Louis: Saunders; 2014.

17.Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 27th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute (M100-S22). 2012; 32(22). Available from: http://zums.ac.ir/files/health/pages/ill/azmayeshghah/clsi_2013.pdf

18.Shahbazi B, Narenji H. Comparison of four methods of DNA extraction from gram-negative and gram-positive bacteria. Zanko J Med Sci. 2014;15(45):9-16.[In Persian]

19.Fazeli N, Momtaz H. Virulence gene profiles of multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa isolated from iranian hospital infections. Iran Red Crescent Med J. 2014;16(10):e15722.

20.Akhavan-Tafti F, Eslami G, Zandi H, Mousavi SM, Zarei M. Prevalence of blaVIM, blaIPM and blaNDM Metallo-Beta-Lactamases Enzymes in Pseudomonas Aeruginosa Isolated from Burn Wounds in Shahid Sadoughi Burn Hospital, Yazd, Iran. J Isfahan Med Sch. 2014; 31(263):10.

21.Golshani Z, Ahadi AM, Sharifzadeh A. Occurrence of ambler class b metallo-β-lactamase gene in imipenem-resistant pseudomonas aeruginosa strains isolated from clinical samples. Zahedan J Res Med Sci. 2014;16(2):6-9. [In Persian]

22.Malek Mohamad S, Rostami S, Zamanzad B, Gholipour A, Drees F. Detection of exotoxins and antimicrobial susceptibility pattern in clinical pseudomonas aeruginosa isolates. Avicenna J Clin Microb Infec. In Press(In Press):e44802.

23.Khorvash F, Yazdani M, Shabani S, Soudi A. Pseudomonas aeruginosa-producing Metallo-β-lactamases (VIM, IMP, SME, and AIM) in the clinical isolates of intensive care units, a university hospital in Isfahan, Iran. Adv Biomed Res. 2017;6:147.

24.Sobouti B, Khosravi N, Daneshvar A, Fallah S, Moradi M, Ghavami Y. Prevalence of beta lactamase producing species of pseudomonas and acinetobacter in pediatric burn patients. Ann Burns Fire Disasters. 2015;28(3):171-7.

25.Liakopoulos A, Mavroidi A, Katsifas EA, Theodosiou A, Karagouni AD, Miriagou V, et al. Carbapenemase-producing Pseudomonas aeruginosafrom central Greece: molecular epidemiology and genetic analysis of class I integrons. BMC Infect Dis. 2013;13(1):505.

26.Hong DJ, Bae IK, Jang IH, Jeong SH, Kang HK, Lee K. Epidemiology and Characteristics of Metallo-β-Lactamase-Producing Pseudomonas aeruginosa. Infect Chemother. 2015;47(2):81-97.

27.Tutunchi F, Zeighami H. Detection of phenazine genes in multi-drug resistant pseudomonas aeruginosa isolates. Pathobiol Res. 2016;19(1):1-11.

28.Radlinski L, Rowe SE, Kartchner LB, Maile R, Cairns BA, Vitko NP, et al. Pseudomonas aeruginosa exoproducts determine antibiotic efficacy against Staphylococcus aureus. PLoS Biol. 2017;15(11):e2003981.

29.Meskini M, Esmaeili D. The study of formulated Zoush ointment against wound infection and gene expression of virulence factors Pseudomonas aeruginosa. BMC Complement Altern Med. 2018;18(1):185.

30.Gupta P, Gupta RK, Harjai K. Multiple virulence factors regulated by quorum sensing may help in establishment and colonisation of urinary tract by Pseudomonas aeruginosa during experimental urinary tract infection. Indian J Med Microbiol. 2013;31(1):29-33.